

# 大鼠 kisspeptin 酶联免疫分析 (ELISA)

## 试剂盒使用说明书

本试剂仅供研究使用 目的：本试剂盒用于测定大鼠血清，细胞上清及相关液体样本中 kisspeptin 的含量。

### 实验原理：

本试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中大鼠 kisspeptin 水平。用纯化的大鼠 kisspeptin 抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入 kisspeptin，再与 HRP 标记的 kisspeptin 抗体结合，形成抗体-抗原-酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 kisspeptin 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度 (OD 值)，通过标准曲线计算样品中大鼠 kisspeptin 浓度。

### 试剂盒组成：

试剂盒组成	96 孔配置	保存
说明书	1 份	
封板膜	2 片 (96)	
密封袋	1 个	
酶标包被板	1×96	2-8℃ 保存
标准品：27ng/ml	0.5ml×1 瓶	2-8℃ 保存
标准品稀释液	1.5ml×1 瓶	2-8℃ 保存
酶标试剂	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
样品稀释液	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 A 液	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
显色剂 B 液	6 ml×1 瓶	2-8℃ 保存
终止液	6ml×1 瓶	2-8℃ 保存
浓缩洗涤液	(20ml×30 倍)×1 瓶	2-8℃ 保存

### 样本处理及要求：

1. 血清：室温血液自然凝固 10-20 分钟，离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清，保存过程中如出现沉淀，应再次离心。
2. 血浆：应根据标本的要求选择 EDTA 或柠檬酸钠作为抗凝剂，混合 10-20 分钟后，离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应该再次离心。
3. 尿液：用无菌管收集，离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清，保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。胸腹水、脑脊液参照实行。
4. 细胞培养上清：检测分泌性的成份时，用无菌管收集。离心 20 分钟左右 (2000-3000 转/分)。仔细收集上清。检测细胞内的成份时，用 PBS (PH7.2-7.4) 稀释细胞悬液，细胞

浓度达到 100 万/ml 左右。通过反复冻融，以使细胞破坏并放出细胞内成份。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。保存过程中如有沉淀形成，应再次离心。

5. 组织标本：切割标本后，称取重量。加入一定量的 PBS，PH7.4。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后仍然保持 2-8℃ 的温度。加入一定量的 PBS（PH7.4），用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 20 分钟左右（2000-3000 转/分）。仔细收集上清。分装后一份待检测，其余冷冻备用。
6. 标本采集后尽早进行提取，提取按相关文献进行，提取后应尽快进行实验。若不能马上进行试验，可将标本放于 -20℃ 保存，但应避免反复冻融。
7. 不能检测含 NaN<sub>3</sub> 的样品，因 NaN<sub>3</sub> 抑制辣根过氧化物酶的（HRP）活性。

#### 操作步骤

1. 标准品的稀释与加样：在酶标包被板上设标准品孔 10 孔，在第一、第二孔中分别加标准品 100μl，然后在第一、第二孔中加标准品稀释液 50μl，混匀；然后从第一孔、第二孔中各取 100μl 分别加到第三孔和第四孔，再在第三、第四孔分别加标准品稀释液 50μl，混匀；然后在第三孔和第四孔中先各取 50μl 弃掉，再各取 50μl 分别加到第五、第六孔中，再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液 50ul，混匀；混匀后从第五、第六孔中各取 50μl 分别加到第七、第八孔中，再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液 50μl，混匀后从第七、第八孔中分别取 50μl 加到第九、第十孔中，再在第九第十孔分别加标准品稀释液 50μl，混匀后从第九第十孔中各取 50μl 弃掉。（稀释后各孔加样量都为 50μl，浓度分别为 18ng/ml, 12ng/ml, 6ng/ml, 3ng/ml, 1.5ng/ml）。
2. 加样：分别设空白孔（空白对照孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、待测样品孔。在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40μl，然后再加待测样品 10μl（样品最终稀释度为 5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。
3. 温育：用封板膜封板后置 37℃ 温育 30 分钟。
4. 配液：将 30 倍浓缩洗涤液用蒸馏水 30 倍稀释后备用。
5. 洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置 30 秒后弃去，如此重复 5 次，拍干。
6. 加酶：每孔加入酶标试剂 50μl，空白孔除外。
7. 温育：操作同 3。
8. 洗涤：操作同 5。
9. 显色：每孔先加入显色剂 A 50μl，再加入显色剂 B 50μl，轻轻震荡混匀，37℃ 避光显色 15 分钟。
10. 终止：每孔加终止液 50μl，终止反应（此时蓝色立转黄色）。
11. 测定：以空白空调零，450nm 波长依序测量各孔的吸光度（OD 值）。测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

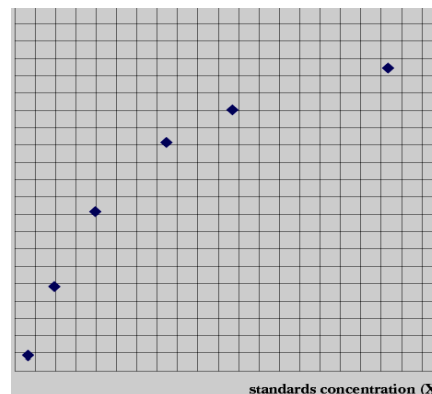
#### 注意事项：

1. 试剂盒从冷藏环境中取出应在室温平衡 15-30 分钟后方可使用，酶标包被板开封后如未用完，板条应装入密封袋中保存。
2. 浓洗涤液可能会有结晶析出，稀释时可在水浴中加温助溶，洗涤时不影响结果。
3. 各步加样均应使用加样器，并经常校对其准确性，以避免试验误差。一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用排枪加样。
4. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。如标本中待测物质含量过高（样本 OD 值大于标准品孔第一孔的 OD 值），请先用样品稀释液稀释一定倍数（n 倍）后再测定，计算时请最后乘以总稀释倍数（×n×5）。

5. 封板膜只限一次性使用，以避免交叉污染。
6. 底物请避光保存。
7. 严格按照说明书的操作进行，试验结果判定必须以酶标仪读数为准。
8. 所有样品，洗涤液和各种废弃物都应按传染物处理。
9. 本试剂不同批号组分不得混用。
10. 如与英文说明书有异，以英文说明书为准。

**计算：**

以标准物的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，在坐标纸上绘出标准曲线，根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度；再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。



(此图仅供参考)

**试剂盒性能：**

1. 样品线性回归与预期浓度相关系数 R 值为 0.95 以上。
2. 批内与批间应分别小于 9%和 11%

**检测范围：**

0.5ng/ml -22ng/ml

**保存条件及有效期：**

1. 试剂盒保存：2-8℃。
2. 有效期：6 个月